

Ε.Μ.Π

ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΕΜΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ
ΚΑΙ
ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

MICROFLUIDICS

στοιχεία θεωρίας
και
εφαρμογές στη βιολογία

ΠΑΠΑΓΓΕΛΑΚΗΣ
ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ
02105676

December 29th 1959

There's Plenty of Room at the Bottom*
An Invitation to Enter a New Field of Physics

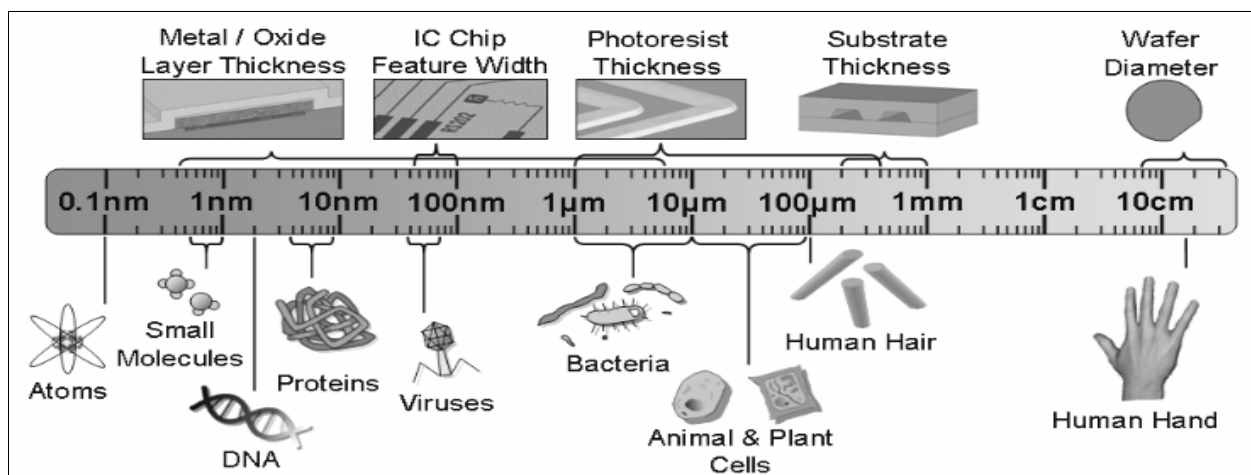
by Richard P. Feynman

"Biology is not simply writing information; it is doing something about it. A biological system can be exceedingly small. Many of the cells are very tiny, but they are very active; they manufacture various substances; they walk around; they wiggle; and they do all kinds of marvelous things – all on a very small scale. Also, they store information. Consider the possibility that we too can make a thing very small which does what we want – that we can manufacture an object that maneuvers at that level!"

Οι εφαρμογές μικρορροών συγκαταλέγονται μεταξύ των κυριότερων προκλήσεων της μηχανικής για αυτό τον αιώνα. Αφορούν στην τυποποίηση μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών** για συνταγογράφηση φαρμάκων με γονιδιακές προδιαγραφές, θεμελιώδη έρευνα στη γενετική και στην ανάλυση πρωτεϊνών (proteomics). Το πεδίο των μικρορροών συνδυάζει μηχανική, χημεία και βιολογία και στοχεύει στη δημιουργία συστημάτων lab-on-chip.

Η τεχνολογία μικρορροών έχει αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια, από μία προσπάθεια μοριακών αναλύσεων στοχευμένη στη βελτίωση τεχνικών διαχωρισμού μέσω των μικρών διαστάσεων, σε ένα πεδίο που επηρεάζει ένα όλο και αυξανόμενο αριθμό επιστημονικών κλάδων. Τεχνικές μικρορροών εφαρμόζονται σε χημεία, βιολογία, bioinformatics, γενετική (genomics), proteomics, φαρμακευτική, biodefense και άλλους τομείς όπου οι εγγενείς ιδιότητες των, υπερτερούν των μέχρι σήμερα χρησιμοποιούμενων μεθοδολογιών.

Από βιολογικής σκοπιάς οι μικρορροές φαίνονται ιδιαίτερα σχετικές με τις περισσότερες βιολογικές διαδικασίες κυρίως επειδή οι τελευταίες αφορούν μικρής κλίμακας συναλλαγή ρευστών σε κάποιο σημείο. Από τη μεταφορά μορίων διαπερνώντας κυτταρικές μεμβράνες, τη διάχυση οξυγόνου μέσω των πνευμόνων και τη ροή του αίματος μέσω δικτύων αρτηριών τριχοειδούς φύσης. Οι μικρορροές μπορούν επίσης να παρέχουν πιο ρεαλιστικά in vitro περιβάλλοντα για βιολογικά δείγματα μικροκλίμακας. Στην εικόνα παρουσιάζονται συγκριτικά μήκη αρκετών βιολογικών δομών, όπως επίσης και συνήθεις μικροδομές που χρησιμοποιούνται σε μικρορροές και τεχνολογία MEMS.



* <http://www.zyvex.com/nanotech/feynman.html>

** Παράρτημα

2. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΜΙΚΡΟΡΡΟΩΝ

μικρότερο δείγμα και κατανάλωση reagents

- οι συσκευές μικρορροών τυπικά χρειάζονται 10^{-2} ως 10^{-3} μικρότερο όγκο δείγματος από τα συμβατικά assays

αυξημένη μεταφορά θερμότητας

- ο αυξημένος λόγος επιφάνειας προς όγκο των μικροκαναλιών αυξάνει τη θερμική διάχυση (dissipation)

γρηγορότερος διαχωρισμός

- υψηλά ηλεκτρικά πεδία έχουν σαν αποτέλεσμα γρηγορότερη μετακίνηση του δείγματος (sample migration)

στρωτή ροή

- χαμηλοί αριθμοί Reynolds μειώνουν τη διασπορά του δείγματος

ηλεκτροκινητικοί χειρισμοί

- η ηλεκτροοσμωτική ροή επιτρέπει την παροχή ρευστού με επίπεδο προφίλ, μόνο με τη χρήση ηλεκτρικών πεδίων

χαμηλότερη κατανάλωση ενέργειας

- λιγότερα μέρη και αυξημένη θερμική διάχυση απαιτούν μικρότερη παροχή ενέργειας

παράλληλοποίηση (parallelization)

- αρκετά assays μπορούν να συνδεθούν μεταξύ τους ή να λειτουργούν παράλληλα σε ένα chip

φορητότητα

- τα ολοκληρωμένα συστήματα (βλέπε parallelization) και οι χαμηλές απαιτήσεις σε ενέργεια επιτρέπουν την ενσωμάτωση των assays και τη διενέργεια των αντίστοιχων εξετάσεων σε φορητές συσκευές

αυξημένη ικανότητα διαχωρισμού

- η απόδοση σε ηλεκτροφορητικούς και χρωματογραφικούς διαχωρισμούς είναι ανάλογη του L/d

3. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΘΕΩΡΙΑΣ

1. Προσέγγιση του συνεχούς μέσου

Σε αντίθεση με τα στερεά, τα ρευστά (ιδιαίτερα τα αέρια) αποτελούνται από μόρια με σχετικά μεγάλη απόσταση μεταξύ τους. Παρά τα γεγονός αυτό, στη ρευστομηχανική ενώ ιδιότητες όπως ταχύτητα και πυκνότητα εμφανίζουν μεγάλες διακυμάνσεις σε μοριακό επίπεδο, τα ρευστά θεωρούνται ως "συνεχή" και οι ιδιότητές τους προσεγγίζονται με "μέσες" τιμές. Για τους όγκους ρευστών που χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές μικρορροών η προσέγγιση αυτή παραμένει ακριβής. Ενδεικτικά, σε ένα picoliter $10[\mu\text{m}^3]$ όγκου ρευστού περιέχονται 3×10^{13} μόρια νερού, αρκετά ώστε να δικαιώνεται η προσέγγιση του συνεχούς μέσου. Τυπικά, για τις περισσότερες ιδότητες, η προσέγγιση αυτή χάνει την ισχύ της για μεγέθη τάξεως κάποιων μοριακών διαμέτρων. Οι εξισώσεις που χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό "κυκλωμάτων" microfluidics είναι αυτές των Navier - Stokes, ισχύει δηλαδή η παραδοχή για την μηχανική του συνεχούς μέσου, με την επίδραση όμως των ηλεκτρικών δυνάμεων όποτε υπάρχει πεδίο, που εδώ παίζουν πρωτεύοντα ρόλο.

Η προσέγγιση του συνεχούς μέσου είναι σημαντική γιατί επιτρέπει την ανάλυση των μικρορροών με τις ίδιες βασικές αρχές της κλασσικής ρευστομηχανικής. Όσο όμως οι

ερευνητές εφαρμόζουν τεχνικές μικρορροών σε όλο και μικρότερες κλίμακες, η προσέγγιση αυτή σταματά να ισχύει και νέα εργαλεία πρέπει να αναπτυχθούν για τη μελέτη των ροών αυτών.

2. Στρωτή ροή

Επειδή οι μικρορροές είναι συνήθως στρωτής φύσης, απλές ροές όπως η ροή Poiseuille είναι συνήθεις. Ροή Poiseuille παρουσιάζεται όταν έχουμε σταθερή, πλήρως ανεπτυγμένη ροή, υπό σταθερή πίεση, νευτώνειου ρευστού σε έναν αγωγό. Το προφίλ ταχύτητας για ροή Poiseuille είναι παραβολικό, με τη μέγιστη ταχύτητα να βρίσκεται στο κέντρο του αγωγού. Οι εξισώσεις για ροή Poiseuille σε κυλινδρικό κανάλι είναι οι εξής:

$$v_z(r) = 2U[1 - (\frac{r}{R})^2]$$

$$U = -\frac{R^2}{8\mu} \frac{dP}{dz}$$

$$Q = -\frac{\pi R^4}{8\mu} \frac{dP}{dz}$$

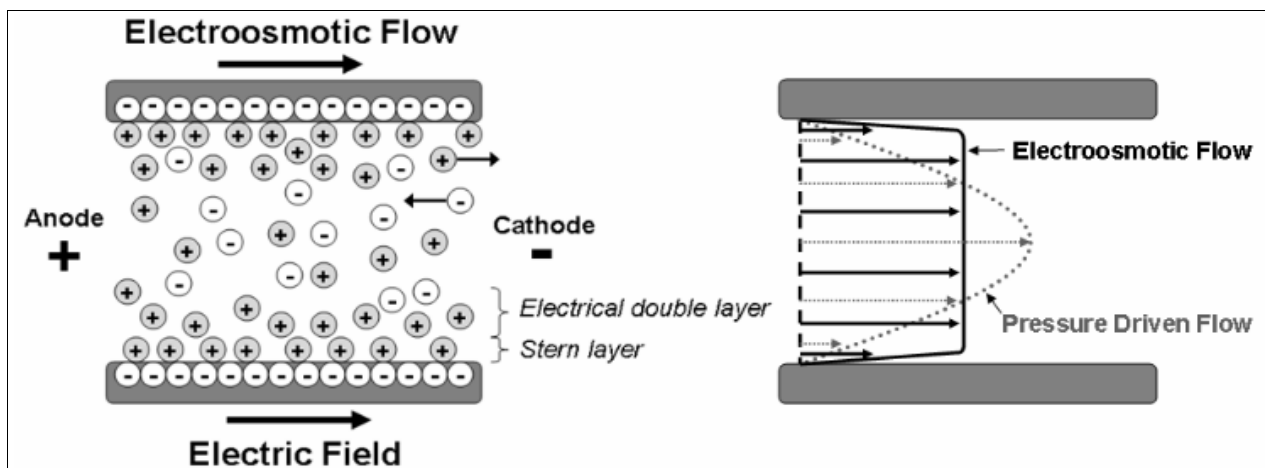
Το γεγονός ότι η ροή είναι στρωτή είναι θετικό σε σχέση με τις απώλειες (είναι μικρότερες) και επιπλέον η ανάμιξη του δείγματος μειώνεται. Υπάρχουν περιπτώσεις βιολογικών εφαρμογών όπου είναι επιθυμητή κάποιοι είδους ανάμιξη. Σε τέτοιες περιπτώσεις το επιθυμητό αποτέλεσμα προκύπτει με την εισαγωγή ιδιαίτερης γεωμετρίας στη ροή.

3. Ηλεκτροκινητική

Η ηλεκτροκινητική ενσωματώνει σειρά μεθόδων για την επιβολή κίνησης σε φορτισμένα σωματίδια ή αγωγίμα μέσα με την επιβολή ηλεκτρικών πεδίων. Βασικά φαινόμενα - τεχνικές που εφαρμόζονται στις μικρορροές είναι:

- Ηλεκτροόσμωση (electroosmosis)

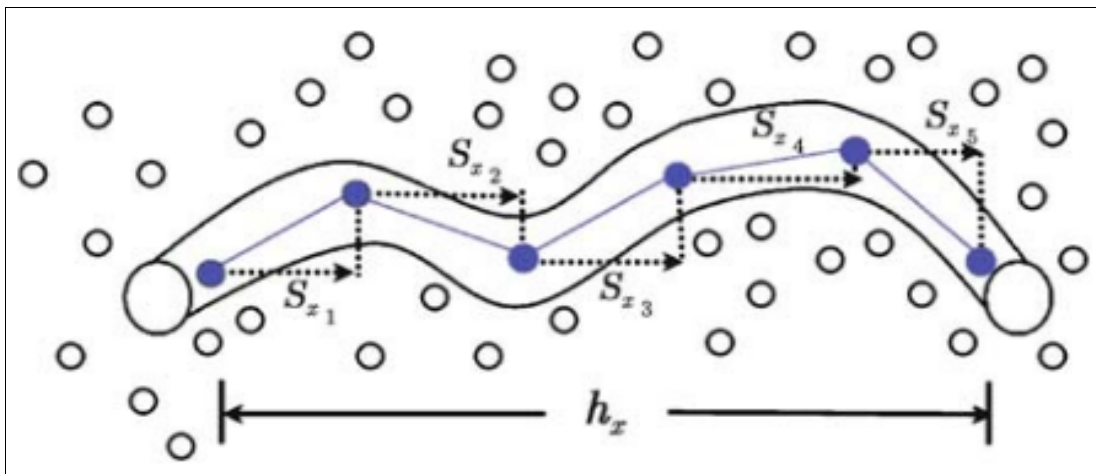
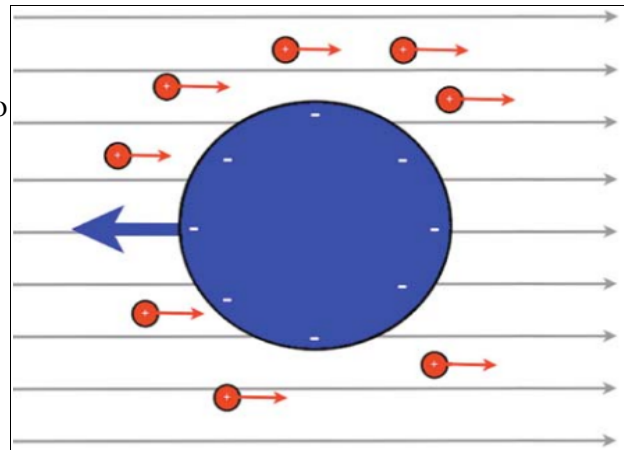
Η ηλεκτροόσμωση είναι η διαδικασία κατά την οποία ηλεκτρολυτικό υγρό σε ένα κανάλι “σύρεται”, λόγω ιξώδους, από τη μετακινούμενα ιόντα κοντά στα φορτισμένα τοιχώματα του καναλιού, υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροόσμωση επιτρέπει την παροχή ρευστού χρησιμοποιώντας μόνο ηλεκτρικά πεδία, καταργώντας έτσι όλα τα κινούμενα μέρη και ένα προφίλ ταχύτητας σχεδόν επίπεδο, που εξαλείφει τη διασπορά που προκαλείται από την παραβολική φύση της ροής Pousseuille.



- Ηλεκτροφόρηση (electrophoresis)

Η ηλεκτροφόρηση είναι απλά η κίνηση ενός φορτισμένου σωματιδίου υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Τα περισσότερα βιομόρια και τα σωματίδια έχουν επιφανειακό φορτίο που θα επάγει δύναμη στην κατεύθυνση του ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροφορητική ταχύτητα u ενός σωματιδίου διέπεται από τη σχέση $u = \mu E$, όπου μ η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των σωματιδίων (εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος και το φορτίο) και E είναι η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροφόρηση επιτρέπει το διαχωρισμό βιολογικών υλικών (π.χ. DNA, πρωτεΐνες, κλπ.) βάσει των ιδιαίτερων ηλεκτροφορητικών κινητικότητων τους (μ). Αρκετές ηλεκτροφορητικές τεχνικές έχουν αναπτυχθεί και εφαρμόζονται για τη βελτίωση διαχωρισμού και εμπλουτισμού αναλυτών με ηλεκτρικό φορτίο. Για παράδειγμα στην ισοηλεκτρική εστίαση (isoelectric focusing - IEF), το δείγμα μετακινείται, μέσω μιας επιβαλλόμενης βαθμίδας pH (pH gradient), στο ισοηλεκτρικό τους σημείο. Ανάλογη τεχνική είναι η εστίαση μέσω βαθμίδας θερμοκρασίας (temperature gradient focusing - TGF) κατά την οποία το δείγμα διαχωρίζεται, βάσει των σχετιζόμενων με τη θερμοκρασία κινητικών του χαρακτηριστικών, κατά μήκος ενός επιβαλλόμενου θερμοκρασιακού πεδίου. Ένα άλλο παράδειγμα περιλαμβάνει την ισοταχοφόρηση (isotachopheresis - ITP) στην οποία τα δείγματα χωρίζονται με βάση τις διαφορετικές ηλεκτροφορητικές κινητικότητες τους, καθώς μετακινούνται μεταξύ αργών και γρήγορων ηλεκτρολυτών.

Σχηματικό διάγραμμα ηλεκτροφόρησης κολλοειδούς σωματιδίου (colloidal particle). Το πεδίο δρα τόσο επί των μικροτέρων μεγέθους ιόντων (counterions) όσο και επί του μακροϊόντος (macroion), ώστε να προκύπτει σχετική κίνηση σε αντίθετες κατευθύνσεις.



Όταν ένας μεγάλος πολυηλεκτρολύτης όπως το DNA ηλεκτροφορείται μέσα σε gel, οι ίνες του gel περιορίζουν το DNA σε σωληνωειδούς μορφής σχηματισμό. Η δύναμη επί των τμημάτων του σωληνωειδούς σχηματισμού εξαρτάται από το διάνυσμα κατεύθυνσης s_x του κάθε τμήματος στο ηλεκτρικό πεδίο. Η συνολική προβολή της αλυσίδας, h_x , είναι το άθροισμα των διανυσμάτων κατεύθυνσης. Η ταχύτητα της αλυσίδας υπολογίζεται από τη μέση ταχύτητα κίνησης της αλυσίδας μέσα από πολλούς σωληνωειδείς σχηματισμούς, κάθε ένας από τους οποίους έχει διαφορετική προβολή h_x .

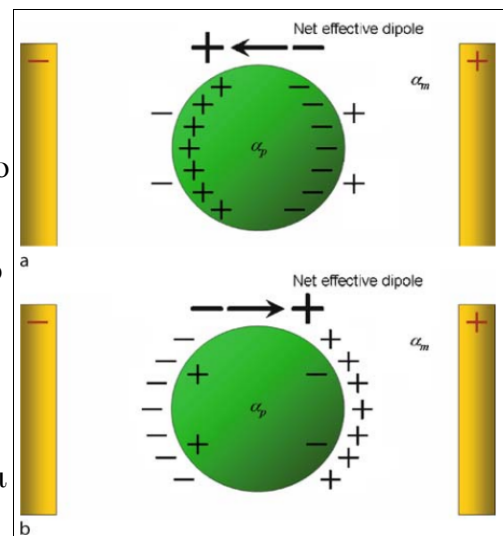
- Διηλεκτροφόρηση (dielectrophoresis)

Σταγονίδια, καθώς και σωματίδια, αιωρούμενα σε υγρό μπορούν εναλλακτικά να χειριστούν με διηλεκτροφόρηση (dielectrophoresis - DEP). Η αρχή λειτουργίας του DEP δε στηρίζεται στο φορτίο των σωματιδίων αλλά στην ικανότητα πόλωσης (polarizability) των σωματιδίων σε σχέση με το περιβάλλον μέσο.

Στην παρουσία μη ομοιόμορφου ηλεκτρικού πεδίου, τα σωματίδια που έχουν μεγαλύτερη ικανότητα πόλωσης από το περιβάλλον μέσο υφίστανται μια δύναμη προς περιοχές υψηλότερης (πεδιακής) έντασης (θετικών DEP). Αντιθέτως, σωματίδια μικρότερης ικανότητα πόλωσης από αυτή του μέσου που τα περιβάλλει υφίστανται δύναμη προς περιοχές χαμηλότερης έντασης. Επειδή η διηλεκτροφορητική δύναμη είναι ανάλογη με την κλίση (βαθμίδα) και όχι με την πολικότητα του ηλεκτρικού πεδίου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν πεδία τόσο AC όσο και DC. Διηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται ευρέως για την παγίδευση βακτηρίων και κυττάρων.

Σχηματικό διάγραμμα που δείχνει πώς διαφορετικά διηλεκτρικά σωματίδια αποκτούν πολικότητα για ικανότητα πόλωσης (α) αρκετά υψηλότερη ή (β) αρκετά χαμηλότερη από αυτή του περιβάλλοντος μέσου.

Για υψηλότερη ικανότητα πόλωσης, μεγαλύτερο φορτίο προκύπτει στο εσωτερικό της διεπιφάνειας σωματιδίου - ρευστού και το δίπολο που δημιουργείται είναι παράλληλο στο εφαρμοσμένο ηλεκτρικό πεδίο. Αν η ικανότητα πόλωσης είναι μικρότερη, περισσότερο φορτίο προκύπτει στο εξωτερικό της διεπιφάνειας, και το δίπολο έχει αντίθετη κατεύθυνση. Στις εικόνες φαίνεται επίσης ότι η ισχύς του πεδίου από τη μία πλευρά του σωματιδίου είναι μεγαλύτερη από την άλλη. Αυτό οδηγεί σε ανισορροπία των δυνάμεων από το επαγόμενο δίπολο, προκαλώντας την κίνηση του σωματιδίου.



4. Αδιάστατοι αριθμοί και φαινόμενα μικρορροών

Διάχυση

Διάχυση, η στοχαστική διαδικασία κατά την οποία μόρια μετακινούνται από μία περιοχή σε μια άλλη, είναι άλλη μία διαδικασία η οποία αποκτά ιδιαίτερη σημασία σε συστήματα μικρορροών όπου οι διαστάσεις των καναλιών μειώνονται. Η διαχυτική μεταφορά οδηγείται από τυχαία θερμική κίνηση των μορίων, ώστε δοθέντος αρκετού χρόνου και με απουσία εξωτερικών επιρροών, ένα δείγμα θα κατανεμηθεί ομοιογενώς σε πεπερασμένο όγκο.

Τα περισσότερα συστήματα μικρορροών συνδυάζουν μεταφορά με διάχυση και συναγωγή του κυρίως ρευστού. Είναι συνεπώς σκόπιμο να διαπιστώνεται η σχετική βαρύτητα κάθε φαινομένου. Ο αριθμός Sherwood, ένας αδιάστατος αριθμός που δίνει την αναλογία της μεταφοράς μάζας από συναγωγή προς τη μεταφορά από διάχυση σε ένα σύστημα, ορίζεται ως:

$$Sh = kd/D,$$

όπου k είναι ο συντελεστής μεταφοράς μάζας, d είναι το χαρακτηριστικό μήκος του συστήματος (π.χ. διάμετρος καναλιού), και D είναι ο συντελεστής διάχυσης. Για τα

περισσότερα συστήματα στη μακροκλίμακα, ο Sh είναι μεγάλος, με αποτέλεσμα η μεταφορά με συναγωγή να κυριαρχεί επί της μεταφοράς με διάχυση. Ωστόσο, για τα συστήματα μικρορροών, ο αριθμός Sherwood είναι πολύ χαμηλότερος λόγω της παρουσίας του συντελεστή του χαρακτηριστικού μήκους κλίμακας στον αριθμητή. Έτσι η διάχυση αποκτά πολύ περισσότερη σημασία στο συστήματα μικρορροών.

Η έντονη παρουσία διάχυσης στα συστήματα μικρορροών προσδίδει πολύ καλή θερμική συμπεριφορά. Όπως συμβαίνει με τα περισσότερα βιολογικά συστήματα και βιοϊατρικές αναλύσεις, πολλές από τις διεργασίες που εκτελούνται σε συσκευές μικρορροών είναι πολύ ευαίσθητες στη θερμοκρασία. Για παράδειγμα, η τεχνική PCR* (Polymerase Chain Reaction) απαιτεί κυκλικές διακυμάνσεις στις θερμοκρασίες των 94 °C, 54 °C και 72 °C.

Όταν προκαλούνται θερμικές διακυμάνσεις με μικροστοιχεία θέρμανσης, είναι σημαντικό να εξασφαλιστεί ότι η θέρμανση είναι σε μια περιοχή απομονωμένη και δεν θα επηρεαστούν δυσμενώς άλλες διεργασίες στη συσκευή. Επιπλέον, πολλές συσκευές μικρορροών περιέχουν ηλεκτρονικά εξαρτήματα που μπορούν να προκαλέσουν θέρμανση λόγω του φαινομένου joule, και, ως εκ τούτου, πρέπει να απομονώνονται με παρόμοιο τρόπο.

Επιφανειακές δυνάμεις και σταγονίδια

Σημαντική διαφορά μεταξύ της κίνησης υγρού στο μακρόκοσμο και το μικρόκοσμο είναι η αυξημένη σημασία της επιφανειακής τάσης στη δεύτερη περίπτωση. Ο αριθμός Bond (Bo), ορίζεται ως:

$$Bo \equiv \frac{\Delta\rho \cdot a \cdot L^2}{\gamma_{12}}$$

Αντιπροσωπεύει τον αδιάστατο συντελεστή των αδρανειακών δυνάμεων ως προς την επιφανειακή τάση σε διεπιφάνεια ρευστού - ρευστού. Δρ είναι η διαφορά πυκνότητας στη διεπαφή, α είναι η επιτάχυνση που σχετίζεται με την αδρανειακή δύναμη, η οποία στις περισσότερες περιπτώσεις είναι το βάρος, L είναι το σχετικό μήκος κλίμακας (συνήθως η ακτίνα ενός σταγονιδίου ή η διάμετρος ενός καναλιού), και γ₁₂ είναι η επιφανειακή τάση μεταξύ των δύο υγρών φάσεων. Η επιφανειακή τάση γ₁₂ μιας διεπαφής ορίζεται ως ολόγος της ελεύθερης ενέργειας Gibbs ανά εμβαδό, για σταθερή πίεση και θερμοκρασία.

$$\gamma \equiv \left(\frac{\partial G}{\partial A} \right)_{p,T}$$

Το μέγεθος των αδρανειακών δυνάμεων σε σχέση με την επιφανειακή τάση μειώνεται γρήγορα όσο μικραίνει το μήκος κλίμακας, μειώνοντας έτσι τον αριθμό Bond. Συστήματα ελέγχου ροής με βάση την επιφανειακή τάση συνήθως χρησιμοποιούν μεταβολές στη γεωμετρία του καναλιού ή υδρόφοβες επιφάνειες ώστε να παρεμποδίσουν ή να επιβάλλουν ροή από πίεση. Η επιφανειακή τάση είναι ιδιαίτερα σημαντική σε μικροσυστήματα σταγονιδίων (αναφέρονται επίσης ως digital - microfluidic) λόγω της αυξημένης αναλογίας επιφάνειας προς όγκο που συνοδεύει τους μειωμένους όγκους υγρών.

* μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ενίσχυση μικρού δείγματος DNA ώστε να μπορεί αυτό να αναλυθεί

Dimensionless number	Definition	Significance	Microfluidic advantage
Reynolds number (Re)	$Re = \frac{ud}{\nu}$	Ratio of inertial forces to viscous forces	Typically Re is small: Results in laminar flow for most microfluidic applications.
Sherwood number (Sh)	$Sh = \frac{kd}{D}$	Ratio of convective to diffusive mass transfer	Typically Sh is small: Diffusion is more important with smaller dimensions.
Bond number (Bo)	$Bo \equiv \frac{\Delta\rho \cdot a \cdot L^2}{\gamma_{12}}$	Ratio of body forces to surface tension forces	Typically Bo is small: Enables pumping via capillary pressure and droplet-based transport systems.

5. Εφαρμογές σε bio - MEMS

Ενώ κατά τα φαινόμενα η τεχνολογία των μικρορροών έχει εφαρμογές σε πολλές περιοχές, όπως manufacturing και aerospace, μέχρι στιγμής έχει σχεδόν αποκλειστικά χρησιμοποιηθεί στο χώρο της βιολογίας.

Genetic analysis (DNA/RNA)

Τις προηγούμενες δεκαετίες η γονιδιακή έρευνα (genomics) παρουσίασε σημαντικά αποτελέσματα με εφαρμογές από genotyping (ταυτοποίηση γονιδιώματος) ως την κλινική διάγνωση. Η αποκωδικοποίηση του ανθρώπινου γονιδιώματος έφερε μαζί της ζήτηση για γρήγορη και υψηλής ικανότητας διεκπεραίωσης γενετικές δοκιμές (assays). Τα συστήματα από μικροκατεργασίες (microfabricated systems) είναι επιθυμητές λύσεις για γρήγορες και οικονομικές γενετικές αναλύσεις που δίνουν τη δυνατότητα για μειωμένο δείγμα, χαμηλό κόστος παραγωγής και μικρό χρόνο λειτουργίας.

Με βάση αρχικά επιτεύγματα σε συνεργαζόμενα συστήματα αντιδράσεων και διαχωρισμού, ενοποιημένες δοκιμές (assays) έχουν αναπτυχθεί σε πλήρως λειτουργικές πλατφόρμες μικρορροών. Ως βασικό στοιχείο των περισσότερων γενετικών δοκιμών, η τεχνική PCR έχει μελετηθεί εκτενώς στα μικροσυστήματα. Τα μικροσυστήματα PCR μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο βασικές κατηγορίες:

- Συστήματα στάσιμης "ροής", όπου το αντιδρών μείγμα παραμένει σε ένα θάλαμο και θερμαίνεται εξωτερικά ή από on chip θερμαντές.
- Συστήματα συνεχούς ροής, στα οποία το αντιδρών μείγμα ρέει μεταξύ ζωνών διαφορετικής θερμοκρασίας με ελεγχόμενο ρυθμό.

Αναφέρονται ενδεικτικά μερικές τεχνικές γενετικής ανάλυσης οι οποίες έχουν υλοποιηθεί σε μικροσυστήματα: DNA sequencing, reverse transcript PCR, restriction digestion, ligase detection reaction (LDR), capillary electrophoresis (CE).

Προσφάτως κατασκευάστηκαν, ενοποιημένα μικροσυστήματα που προετοιμάζουν το δείγμα, επιτελούν τη δοκιμή και ανιχνεύουν τα αποτελέσματα, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα για γρήγορη συλλογή γενετικής πληροφορίας από ακατέργαστο βιολογικό δείγμα. Εκτός από τη γενετική ανάλυση, συσκευές μικρορροών έχουν συνδυαστεί με μικροηλεκτρονικά, με σκοπό την μελέτη της δυναμικής συμπεριφοράς μονονουκλεοτιδίων DNA/RNA και την επίδραση μεταξύ των τελευταίων και των πρωτεϊνών.

Proteomics (εντοπισμός της αλληλουχίας των αμινοξέων διαφόρων πρωτεϊνών)

Η περιοχή των proteomics είναι αυτή τη στιγμή μία περιοχή με μεγάλο βιολογικό ενδιαφέρον και αρκετές προκλήσεις. Ένας ανθρώπινος "πρωτεϊνικός χάρτης", παρόμοιος με αυτόν του ανθρώπινου γονιδιώματος, θα ήταν τεράστιας σημασίας για τους επιστήμονες που μελετούν τις επιδράσεις του περιβάλλοντος, ασθενειών και φαρμάκων στο ανθρώπινο σώμα. Ένας τέτοιος στόχος απαιτεί συσκευές υψηλής δυναμικότητας διεκπεραίωσης για μοριακές διερευνήσεις κυτταρικών συνθέσεων. Επιπλέον οι πρωτεΐνες παίζουν ρόλο και στην κλινική διαγνωστική, όπου σχετικές συγκεντρώσεις πρωτεϊνικών δεικτών (protein biomarkers) σε υγρό του σώματος μπορεί να υποδηλώνουν κάποια ασθένεια.

Λόγω της ποικιλομορφίας των αλυσίδων αμινοξέων, οι πρωτεΐνες είναι περισσότερο πολύπλοκες και επιδεικνύουν πολύ μεγαλύτερο εύρος στη δομή τους από το DNA και το RNA. Επίσης σε αντίθεση με το DNA και το RNA, για τις πρωτεΐνες δεν υπάρχει κάποια μέθοδος καλλιέργειας (self amplification procedure). Συνεπώς το δείγμα πρέπει να έχει την κατάλληλη συγκέντρωση ή να εμπλουτιστεί ώστε να περιέλθει στη διακριτική ικανότητα των οργάνων. Επιπλέον οι πρωτεΐνες είναι ασταθείς τόσο στη θερμοκρασία όσο και στη φυσιολογία τους, κάτι που συνεπάγεται προσοχή στο σχεδιασμό και τη λειτουργία συσκευών μικρορροών που τις διαχειρίζονται.

Κυτταρικές δοκιμές (cellular assays)

Λόγω της δυνατότητας ελέγχου και της αναπαραγωγής συστημάτων μικρορροών, η σμίκρυνση των κυτταρικών καλλιεργειών και των αντίστοιχων δοκιμών (assays) έχει μελετηθεί διεξοδικά. Οι μικρορροές έχει αποδειχθεί ότι παρέχουν πιο γνήσια in vitro περιβάλλοντα από τις παραδοσιακές τεχνικές καλλιέργειας των κυττάρων, λόγω της αποτελεσματικότερης μεταφοράς θερμότητας και μάζας. Σειριακή επεξεργασία και παραλληλοποίηση έχουν επίσης συνεισφέρει στην υψηλή ικανότητα διεκπεραίωσης δοκιμών σε ένα μόνο chip. Για ευκαρυωτικά κύτταρα, βιολογικά συμβατά υλικά (όπως PDMS) μπορεί να δομηθούν ως εξωκυττάρια μήτρα χρησιμοποιώντας μεθόδους μικροκατεργασιών. Αυτός ο έλεγχος του επιφανειακού σχήματος έχει χρησιμοποιηθεί για να διερευνηθεί η κυτταρική φυσιολογία σε διάφορα περιβάλλοντα καλλιέργειας. Επιπλέον, με χρήση καλά ελεγχόμενης στρωτής ροής επιτυγχάνεται ακριβής χειρισμός των κυττάρων, χρησιμοποιώντας για παράδειγμα βαθμίδα pH (pH gradient) ή θερμοκρασιακά βήματα (temperature steps).

Ο συνδυασμός των μικρορροών και κυτταρικής καλλιέργειας χρησιμοποιείται ευρέως στον τομέα της μικροβιακής έρευνας. Επίσης, ακινητοποίηση βακτηρίων, έλεγχος της κυτταρικής μορφολογίας, και ανάλυση δυναμικής βακτηριδιακών πληθυσμών έχουν διευκολυνθεί με συσκευές μικρορροών. Ένα άλλο σημαντικό πεδίο έρευνας είναι αυτό των μονοκύτταρων δοκιμών (single cell assays). Οι μονοκύτταρες δοκιμές εξαλείφουν τη μακροσκοπική συμπεριφορά που εμφανίζουν σύνολα κυτταρικών πληθυσμών και επιτρέπουν την ακριβή έρευνα μεμονωμένων κυττάρων. Ένα ευρύ φάσμα μεθόδων απομόνωσης έχουν αναπτυχθεί, όπως η υδροδυναμική εστίαση, γέννηση μικροσταγόνων, microwell assays, και δοκιμές φυσικού φραγμού (physical barrier arrays).

Χορήγηση φαρμάκων και συμβατότητα (drug delivery and compatibility)

Εκτός από εκτεταμένες εφαρμογές στην ανάλυση και τη διάγνωση, οι συσκευές μικρορροών προσφέρουν επίσης αρκετά πλεονεκτήματα για in vivo εφαρμογές, κυρίως για χορήγηση φαρμάκων. Με τη χορήγηση φαρμάκων μέσω συσκευών μικρορροών είναι δυνατόν να παρέχονται κατάλληλες συγκεντρώσεις των φαρμάκων στοχευμένα, με ελεγχόμενη απελευθέρωση της ουσίας τόσο ως προς την ποσότητα όσο και ως προς το ρυθμό. Επίσης, η συσκευές αυτές συνδυάζουν μειωμένο μέγεθος και κατανάλωση ισχύος, απλή λειτουργία, και την ικανότητα να επιτυγχάνουν πολύπλοκα σχήματα απελευθέρωσης της ουσίας, π.χ. συνεχή ή παλμική έγχυση (continuous or pulsatile release).

Τα μικροσυστήματα χορήγησης φαρμάκων μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κύριες ομάδες:

- βιοκάψουλες (biocapsules) και μικροσωματίδια (microparticles) για ελεγχόμενη και στοχευμένη απελευθέρωση των φαρμάκων
- μικροβελόνες (microneedles) για υποδόρια και ενδοφλέβια χορήγηση
- εμφυτεύσιμα μικροσυστήματα.

Οι βιοκάψουλες (biocapsules) περιέχουν συνήθως μικρο/νανο-πορώδεις βιοσυμβατές μεμβράνες για ενθυλάκωσης της (φαρμακευτικής) ουσίας. Σήμερα, μικροσωματίδια διάφορες σχημάτων και μεγεθών μπορεί να κατασκευαστούν χρησιμοποιώντας συνήθεις τεχνικές μικροκατεργασιών. Σε συνδυασμό με το κατάλληλο επιχρίσματα, τα μικροσωματίδια παρέχουν αποτελεσματική, στοχευμένη, παροχή ιδιαίτερα για ουσίες με βάση πεπτίδια ή πρωτεΐνες.

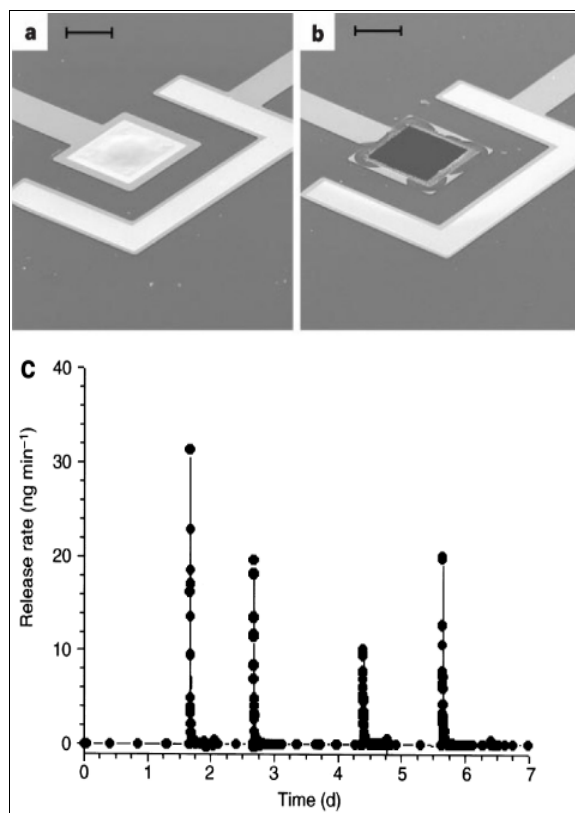
Οι περισσότερες συσκευές μικροβελόνων έχουν ενσωματωμένο κάποιο σύστημα μικροαντλίας (micropumping) για τον έλεγχο της δόσης. Εμφυτεύσιμα μικροσυστήματα είναι περισσότερο κατάλληλα για θεραπείες οι οποίες απαιτούν πολλές ενέσεις για ορισμένο χρονικό διάστημα, διότι όχι μόνο μπορούν να μειώσουν τους χρόνους έγχυσης, αλλά με ακρίβεια να ελέγξουν τους ρυθμούς απελευθέρωσης της ουσίας.

Με τη δημιουργία εμφυτεύσιμων μικροαισθητήρων (microsensors) υπάρχει πλέον και η δυνατότητα για την κατασκευή "έξυπνων" συσκευών χορήγησης φαρμάκων. Αυτές οι συσκευές θα λειτουργούν χωρίς καμία ανθρώπινη παρέμβαση από:

- παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο των βιολογικών χαρακτηριστικών του στόχου με χρήση μικροαισθητήρων.
- τη μετατροπή αυτών των βιολογικών χαρακτηριστικών σε ανιχνεύσιμο σήμα
- τον έλεγχο της απελευθέρωσης του φαρμάκου μέσω μικροεπενεργητών βάσει του σήματος αυτού.

Ο προκύπτων κλειστός βρόχος χορήγησης ουσίας μπορεί να παρέχει στον ασθενή αυτοελεγχόμενη θεραπεία. Σημαντικό θέμα που πρέπει να ληφθεί υπόψη κατά το σχεδιασμό μικροσυστημάτων για βιολογικές εφαρμογές είναι η βιοσυμβατότητα των υποστρωμάτων της συσκευής - την αλληλεπίδραση δηλαδή των συσκευών αυτών με το αντίστοιχο βιολογικό in vitro ή in vivo περιβάλλον, ώστε να εξασφαλίζεται η σωστή λειτουργία για το επιθυμητό χρονικό διάστημα.

Εμφυτεύσιμη συσκευής απελευθέρωσης στο οποίο το χρυσό κάλυμμα της ανόδου (α), έχει αφαιρεθεί στο (β) μέσω της εφαρμογής ενός ηλεκτρικού πεδίου ώστε να εκκινήσει η απελευθέρωση του φαρμάκου από ένα μικροδοχείο. Το διάγραμμα στο (c) δείχνει το ρυθμός απελευθέρωσης από το δοχείο κατά τη διάρκεια κάποιων ημερών.



6. Κατασκευή

Αρχικά τα συστήματα μικρορροών χρησιμοποιούσαν κυρίως το πυρίτιο ως υπόστρωμα εξαιτίας της ποικιλίας των υπαρχουσών τεχνικών κατασκευής των μικροηλεκτρονικών συστημάτων. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν καθιερωμένες τεχνικές φωτολιθογραφίας και κατεργασίες χάραξης για την κατασκευή καναλιών μικρορροών με ακριβείς διαστάσεις σε δισκία σιλικόνης. Καθώς η έρευνα προχώρησε, η έμφαση μετατοπίζεται από το πυρίτιο σε υποστρώματα γυαλιού. Το γυαλί παρουσίασε μια σειρά από πλεονεκτήματα σε σχέση με το πυρίτιο. Ίσως το πιο προφανές πλεονέκτημα είναι ότι το γυαλί είναι διαφανές, επιτρέποντας την οπτικοποίηση απεικόνιση των on-chip διεργασιών όπως επίσης και απλή ανίχνευση για δοκιμές διαχωρισμού. Επιπλέον, το γυαλί είναι πιο συμβατό με την ηλεκτροοσμωτική ροή, η οποία ήταν αναμφίβολα ο κυρίαρχος μηχανισμός προώθησης, από το αγωγίμο πυρίτιο. Από την άποψη παραγωγής, το γυαλί μπορεί να συνδεθεί σε έναν δεύτερο υπόστρωμα πιο εύκολα από το πυρίτιο. Γενικά, αν και το κόστος του γυαλιού και τον δισκίων πυριτίου είναι περίπου το ίδιο, το γυαλί επικράτησε ως ένα απλούστερο και πιο γενικευμένο υλικό για τις μικρορροές.

Οι εγκαταστάσεις μικρορροών απαιτούν κατασκευή και σχεδίαση που διαφέρει από τις εγκαταστάσεις κανονικών διαστάσεων. Δεν είναι εν γένει δυνατή η μεταφορά συμβατικών συσκευών στη μικροκλίμακα με την προσδοκία στη συνέχεια αυτές να εργαστούν σε εφαρμογές μικρορροών. Όταν οι διαστάσεις της συσκευής ή του συστήματος φτάσουν ένα ορισμένο μέγεθος, καθώς οι τάξεις μεγέθους μειώνονται, αυτή καθίσταται συγκρίσιμη σε μέγεθος με τα μόρια του υγρού, ή τα σωματίδια που αιωρούνται στο υγρό. Αυτό αλλάζει δραματικά συμπεριφορά του συστήματος. Η τριχοειδής δράση αλλάζει τον τρόπο με τον οποίο τα υγρά διέρχονται από διαμέτρους σωλήνων μεγέθους μικρομέτρων [μm]. Επιπλέον αστάθμητοι παράγοντες που εμπλέκονται είναι η μεταφορά θερμότητας και μάζας σε αυτές τις τάξεις μεγέθους.

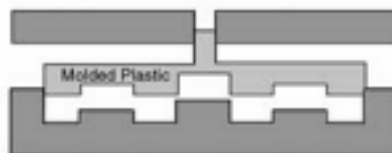
A) Injection Molding



Mold fabricated by conventional micromachining



Plastic melt forced into the mold at high pressure



Separation of molded part from Master

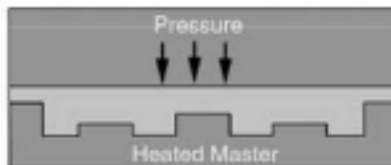


Post processing and lamination to substrate

B) Hot Embossing



Master fabricated by conventional micromachining

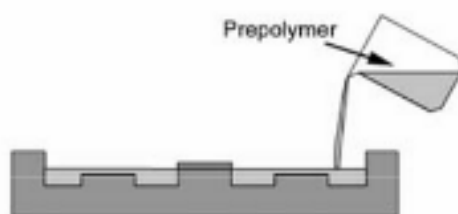


Embossing using applied pressure for local melting and molding



Removal of molded part after cooling and lamination

C) Casting



Casting by pouring low viscosity, low surface energy prepolymer into mold

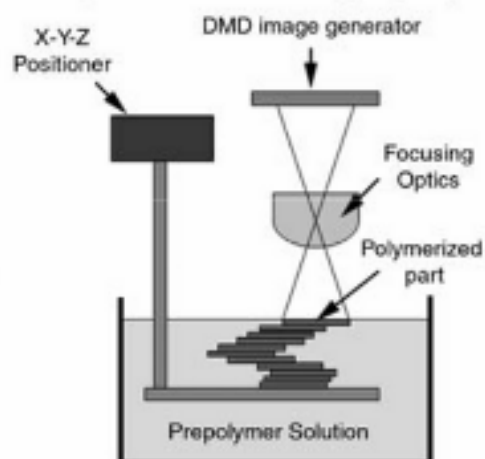


Polymerization by thermal or UV initiation



Part removed and laminated

D) StereoLithography



3-D part construction by UV initiated local polymerization

Παράρτημα 1:

<http://biolexikon.blogspot.gr/2010/10/snps-single-nucleotide-polymorphism-snp.html>

**SNP's (Single Nucleotide Polymorphism, SNP or snip) :
μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί**

είναι παραλλαγές νουκλεοτιδίων στην ίδια γενετική θέση της αλληλουχίας DNA είτε είναι σε γονίδιο (και ενδεχομένως και στην πρωτεΐνη που κωδικοποιεί) είτε σε άλλες θέσεις του γονιδιόματος. Η αλλαγή αυτή που προκαλεί αντικατάσταση μιας βάσης από μία άλλη μεταξύ της αδενίνης (A), κυτοσίνης (C), γουανίνης (G), και θυμίνης (T) στην αλληλουχία του DNA χρησιμοποιείται ευρέως στη μοριακή βιβλιογραφία για τον εντοπισμό του μητρικού από το πατρικό χρωμόσωμα για διάφορα γονίδια. Ευρεία είναι η χρήση κάποιων ιδιαίτερα πολυμορφικών στην ιατροδικαστική (ταυτοποίηση DNA μεταξύ θύματος και θύτη).

Για να θεωρηθεί μία μονονουκλεοτιδική αλλαγή πολυμορφική θα πρέπει να παρατηρείται σε συχνότητα >1% του γενικού πληθυσμού (κατά προτίμηση της ίδιας φυλής). Τα τελευταία χρόνια φάνηκε ότι κάποια SNP's ενδεχομένως να μην είναι τυχαία απλές παραλλαγές από τυχαίες μεταλλάξεις (πολυμορφισμοί) αλλά να συνδέονται με επιβάρυνση ή προστασία από μια παθολογική κατάσταση επηρεάζοντας αλλά όχι αλλάζοντας τη δράση κάποιας σημαντικής πρωτεΐνης. Με τον τρόπο αυτό έχουν αρχίσει μεγάλες μελέτες όπου μελετώνται σχέση συγγεκριμένων SNP's με ομάδες ασθενών όπως ασθενείς με επιληψία ή σχιζοφρένεια. Επίσης επειδή τα SNP's δεν είναι επικίνδυνα για τη ζωή, κληρονομούνται με σταθερό τρόπο από γενιά σε γενιά από τη στιγμή που δημιουργούνται, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιούνται και σε πληθυσμιακές μελέτες για την καταγωγή των ανθρώπων ιστορικά.

Μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί πάνω από 5 εκατομμύρια SNP's ενώ έχει ξεκινήσει μια προσπάθεια καταγραφής των διαφορετικών SNP'S (HapMap) από 4 διαφορετικούς πληθυσμούς (Ασία, Αφρική, Αμερική, Ευρώπη) ελέγχοντας όλο το γονιδίωμα και καταγράφοντας τα αποτελέσματα σε μια διεθνή τράπεζα δεδομένων.

<http://snp.cshl.org/>

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Microfluidics for Biological Applications , Wei-Cheng Tian · Erin Finehout (Editors)
2. Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics , Dongqing Li (Ed.)
3. Theoretical Microfluidics , Henrik Bruus